

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL

**ZYMOMONAS NATIVAS DE LA FERMENTACIÓN DEL
MEZCAL CON GRAN CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE
ETANOL.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

PAZ MIGUEL ANTONIO DE JESUS

ASESOR:

DR. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ.

COMISIÓN REVISORA:

DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ

M.C JORGE MIGUEL MARTINEZ CANSECO

M.I MARCO ANTONIO MALDONADO NUÑEZ

M.C JAIME GALVÁN ESPINOZA

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y mis padres, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo y en especial a mi mejor amiga y novia que nunca dejó que me rindiera y me ayudó en las situaciones más difíciles.

Mi agradecimiento más sincero a mis asesores, a la Dra. Claudia y al Dr. Palma por apoyarme en el proyecto, así como permitirme desarrollar este proyecto en su laboratorio.

También quiero agradecer a cada una de las personas que hicieron posible no sólo mi desarrollo profesional sino personal. A todos mis profesores por sus enseñanzas.

INDICE GENERAL

RESUMEN	7
INTRODUCCION	8
OBJETIVOS.....	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECIFICOS	10
JUSTIFICACION.....	11
CAPITULO 1 MARCO TEÓRICO.....	12
1.1 Características del mezcal.....	12
1.1.1 Etapas de producción.....	12
1.1.2 Fermentación alcohólica.	13
1.1.3 Glucolisis	14
1.1.4 Compuestos volátiles.....	15
1.1.5 Microorganismos involucrados.	15
1.2 Zymomona Mobilis.....	16
1.2.1 Antecedentes	18
1.2.2 Necesidades nutritivas	20
1.2.3 Ruta metabólica	20
1.2.4 Efecto de la temperatura.	24
1.2.5 Efecto del etanol.	24
1.2.6 Efecto del pH.	25
1.3 Fermentación en medio estándar.	25
1.3.1 Crecimiento microbiano y preinóculo.....	25
1.4 Aplicaciones industriales.	27
CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS	29
2.1 Muestreo.	29
2.2 Aislamiento.	29
2.3 Siembra en medio selectivo.....	30
2.4 Morfología microscópica.	31
2.5 Pruebas Bioquímicas.....	32
2.6 Prueba de fermentación en medio estándar WL.	33
2.7 Fermentación en <i>Agave angustifolia Haw.</i>	34
2.8 Destilación simple.....	34
2.9 Método de Dubois.	34

2.10 Método por peso seco	35
2.11 UFC/ml (Escala McFarland).....	36
2.13 Modelo de Gompertz.	39
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	40
3.1 Pruebas Bioquímicas.....	40
3.2 Cinética de Crecimiento en medio estándar.	42
3.2.1 Crecimiento celular de <i>Zymomona mobilis</i> ITOLIV012 y ITOLIV013 en Dextrosa, Sacarosa, Fructosa.....	42
3.2.2 Generacion de Biomasa	44
3.2.2.1 Generación de Biomasa por las cepas ITOLIV012 Y ITOLIV013, en Dextrosa, Sacarosa y Fructosa	44
3.2.3 Consumo de sustrato y formacion de producto.....	46
3.2.3.1 Consumo de Sustrato (Dextrosa, Sacarosa y Fructosa) por las cepas ITOLIV012 Y ITOLIV013	46
3.2.3.2 Formación de Producto.	48
3.3 Cinética de crecimiento en mosto de <i>Agave angustifolia</i> Haw.	50
3.3.1 Crecimiento celular en mosto de <i>Agave angustifolia</i> Haw de ITOLIV012 Y ITOLIV013.	50
3.3.2 Generación de Biomasa.	51
3.3.2.1 Generación de Biomasa por las cepas ITOLIV012 Y ITOLIV013, en mosto de <i>Agave angustifolia</i> Haw.	51
3.3.3 Consumo de Sustrato y formación de producto	52
3.3.3.1 Consumo de sustrato en <i>Agave angustifolia</i> Haw por ITOLIV012 Y ITOLIV013.	52
3.3.3.2 Formación de producto.	53
3.4 Destilación Simple.	55
CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	56
CAPITULO 5. BIBLIOGRAFIA.	58

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Proceso de producción de mezcal en Oaxaca. Fuente: López 2020.	13
FIGURA 2.	Fermentación alcohólica. Fuente: Espinosa (2013).	14
FIGURA 3.	Via lineal de Entner-Doudoroff en <i>Z.mobilis</i> . Fuente: (Garcia 2003).	22
FIGURA 4.	Ruta metabólica de fermentación de etanol (ED) en <i>Zymomonas mobilis</i> . Fuente: (Bai 2008).	23
FIGURA 5.	Concentración de biomasa y sustrato. Fuente: Dunn 2003.	26
FIGURA 6.	Método de Diluciones.	30
FIGURA 7.	Método de Dubois et al. Fuente: propia.	35
FIGURA 8.	Método por peso seco. Fuente: propia	35
FIGURA 9.	Metabolismo de la glucosa y fructosa en <i>Z. mobilis</i> . Fuente: (Lee & Huang 2000).	37
FIGURA 10.	Crecimiento celular ITOLIV012 en a), b) y c) a las 24 hrs.	43
FIGURA 11.	Crecimiento celular ITOLIV013 en a), b) y c) a las 24 hrs.	44
FIGURA 12.	Generación de biomasa ITOLIV012 en a), b) y c) a las 24 hrs	45
FIGURA 13.	Generación de biomasa ITOLIV013 en a), b) y c) a las 24 hrs	46
FIGURA 14.	Consumo de sustrato por ITOLIV012 en a), b) y c) a las 24 hrs	47
FIGURA 15.	Consumo de sustrato por ITOLIV013 en a), b) y c) a las 24 hrs	48
FIGURA 16.	Consumo de sustrato por ITOLIV012 en a), b) y c) a las 24 hrs.	49
FIGURA 17.	Consumo de sustrato por ITOLIV013 en a), b) y c) a las 24 hrs.	50
FIGURA 18.	Crecimiento celular ITOLIV012 y ITOLIV013 en mosto de Agave angustifolia Haw a las 264 hrs.	51
FIGURA 19.	Generación de Biomasa por ITOLIV012 Y ITOLIV013 en mosto de Agave angustifolia Haw a las 264 hrs.	52
FIGURA 20.	Consumo de sustrato en agave Angustifolia Haw por ITOLIV012 y ITOLIV013 a las 264 hrs.	53
FIGURA 21.	Formación de etanol teórico de ITOLIV012 Y ITOLIV013 en mosto de Agave angustifolia Haw a las 264 hrs.	54
FIGURA 22.	Equipo de Destilación Simple.	55

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Principales características de <i>Zymomona mobilis</i> .	17
TABLA 2.	Aislamientos previos de <i>Zymomona mobilis</i> en agar WLD.	19
TABLA 3.	Cantidades para preparación de WLD.	31
TABLA 4.	Pruebas Bioquímicas para <i>Zymomona mobilis</i> .	32
TABLA 5.	Componentes del medio estándar para prueba de fermentación, variando fuente de carbono.	33
TABLA 6.	Resultados de las pruebas bioquímica.	40
TABLA 7.	ITOLIV012 Y ITOLIV013.	42

RESUMEN

A partir de las muestras de mosto de San Pedro Teozacoalco y San Luis Amatlán-Miahuatlán, se pudo caracterizar y aislar a la bacteria *Zymomona mobilis*. Para la identificación y caracterización de estas bacterias gramnegativas se realizaron pruebas bioquímicas dadas para el microorganismo en estudio, para realizar estas pruebas se dispuso de múltiples medios, los cuales se deben aplicar de acuerdo a las exigencias del microorganismo en estudio y basándonos en diferentes bibliografías, lo cual confirma la presencia de esta bacteria en el mosto de mezcal de San Pedro Teozacoalco. Se realizó el crecimiento cinético para conocer la velocidad de reproducción, consumo y preferencia de azúcar, así como la producción de etanol teórico de estas bacterias, cumpliendo así los objetivos planteados.

INTRODUCCION

La variedad de bebidas alcohólicas que se producen en comunidades rurales es muy amplia, en algunos casos estas bebidas se remontan a cientos de años, son parte de una tradición, de las costumbres de comunidades y pueblos. (Vaughan, 2013).

Una de ellas es el mezcal una bebida tradicional mexicana. Cuya definición etimológica proviene del náhuatl Metl e Ixcalli que significan “agave cocido al horno” (Jacques et al., 2006).

Es definido científicamente por la (NOM-070-SCFI-1994) como "bebida alcohólica que se obtiene por la destilación y rectificación de los mostos (o jugos) preparados directamente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, mismas que son previamente cocidas y sometidas a fermentación alcohólica". El aroma y el sabor característicos del mezcal están influenciados por la mezcla de compuestos producidos durante la fermentación y por los proporcionados por el tipo particular de agave utilizado (Escalante et al., 2008).

El proceso de fermentación en el mezcal se produce de manera natural por diversos microorganismos, entre los que destacan las levaduras y las bacterias. Sin embargo, a diferencia de otros procesos fermentativos como lo que ocurren en los vinos, la microflora que interviene en la fermentación alcohólica del mezcal no ha sido completamente identificada y caracterizada aun cuando este es un producto de fuerte arraigo cultural y gran importancia económica (Durán et al., 2007).

El proceso de fermentación inicia en el mosto, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias etanólicas. (Escalante et al., 2004).

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son unos de los microorganismos fundamentales en la biotecnología alimenticia (Vaughan, 2013).

Enfocándose en las bacterias ácido lácticas, uno de los microorganismos que recientemente ha sido objeto de numerosos estudios sobre la producción de alcohol es la *Zymomonas mobilis*. Esta bacteria ha despertado gran interés en la comunidad biotecnológica del mundo por su alta velocidad de fermentación. (Abarca 2010).

Zymomonas mobilis (Zm), quien, por su consumo rápido de glucosa en procesos de fermentación y bajas de pH en el medio, han despertado interés desde la década de los 30. (Matiz 2002).

Esta bacteria ha presentado niveles de 10% mayor producción de etanol que las levaduras, en estas la eficiencia en la hidrólisis de sacarosa más alta reportada es de 90%, mientras *Zymomona mobilis* a alcanzado entre 97 y 98% (Gutierrez Mora, 1987)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Aislar, Identificar y evaluar la capacidad de fermentación alcohólica de cepas nativas de *Zymomonas mobilis* aisladas de dos Palenques en Oaxaca, San Pedro Teozacoalco y San Luis Amatlán Miahuatlán.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar y purificar cepas nativas de *Zymomona mobilis* en agar selectivo W.L.D.
- Identificar las cepas de *Zymomona mobilis* mediante técnicas convencionales.
- Realizar cinéticas de crecimiento con tres fuentes de carbono diferentes y evaluar su producción de etanol teórico.

JUSTIFICACION

México debido a la denominación de origen es el único productor de mezcal el cual tiene una importancia económica para los estados donde se elabora, además de ser una bebida artesanal del país, por lo que hace falta realizar más investigaciones acerca del consorcio microbiano que se encuentra involucrado en la fermentación alcohólica del mezcal.

En la mayor parte de los destilados de Agave, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la más tolerante a altas concentraciones de etanol, sin embargo existen bacterias ácido lácticas, como *Zymomona mobilis* que aportan compuestos volátiles aromáticos importantes durante el proceso de fermentación, además de presentar mayor tolerancia al etanol que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de ahí la trascendencia de aislar a *Zymomona mobilis* nativas que puedan ser utilizadas para la formulación de un inóculo que permita producir un mezcal con excelente calidad, mejores características organolépticas y menor tiempo de fermentación.

Además de ser una potencial productora de etanol en procesos de producción de energías alternativas.

CAPITULO 1 MARCO TEÓRICO.

1.1 Características del mezcal.

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México, que se elabora a partir de diferentes especies de Agave. En el estado de Oaxaca la especie más utilizada es *Agave angustifolia Haw*, o maguey espadín (Palma-Cruz, 1991).

El mezcal es obtenido a partir de las plantas de agaves pertenecientes a la familia Agavácea. En México este género es muy diverso y está representado por 136 especies de agave (Flores et al, 2005). Sin embargo, el mezcal se obtiene únicamente a partir de unas cuantas especies. La bebida es producida en diferentes estados de la república mexicana. La mayor producción se da en el estado de Oaxaca a partir de las especies de mostos destilados del agave *espadín Agave angustifolia Haw* y del Agave silvestre tóbala *Agave potatorum Zucc* (Colunga y Zizumbo, 2007) y como detalle de su característica artesanal, esta bebida es conocida por un gusano que se introduce en la botella, este es una larva de una especie de plaga que vive en las plantas de agave. En el estado de Oaxaca el mezcal es producido en diferentes regiones como Tlacolula, Sola de Vega, Matatlán, Ejutla, Miahuatlán, Yautepec, Ocotlán, Zimatlán.

1.1.1 Etapas de producción.

La producción de mezcal comprende cinco etapas: corte o cosecha del Agave, cocción, molienda, fermentación y destilación, como se muestra en la figura 1. La fermentación es la etapa más importante y crítica del proceso, pues de ello dependerán las cualidades sensoriales del producto final; naturalmente es espontánea, con la participación de la microbiota nativa, la cual transforma a los azúcares que contiene el Agave en etanol, CO_2 , y otros compuestos que forman parte integral de la rica gama de sabores y aromas del mezcal. (López 2020).



FIGURA 1. Proceso de producción de mezcal en Oaxaca. Fuente: López 2020.

1.1.2 Fermentación alcohólica.

Podemos definir a este tipo de fermentación como el proceso bioquímico por el cual el consorcio microbiano transforman los azúcares del mosto en etanol y CO_2 (Zambonelli, 1988; Navarre, 1994). Para que la fermentación alcohólica tenga lugar, el mosto debe hallarse en condiciones de limitación de oxígeno. Bajo estas condiciones las levaduras realizan la degradación de los azúcares de forma incompleta generando etanol, CO_2 y energía. El rendimiento en biomasa de estas levaduras es de tan solo 1 g por cada 100g de azúcares consumidos (Mesas y Alegre, 1999).

Se puede considerar que la fermentación tiene tres grandes objetivos como menciona (Kirchmayr *et. al* 2014):

1. Lograr una máxima conversión de los azúcares de los agaves en alcohol.
2. Generar compuestos volátiles agradables que repercutirán en la calidad del mezcal producido.
3. Evitar la producción de sustancias no deseadas como la acidez.

La fermentación del mezcal en Oaxaca, es una de las etapas más importantes del proceso, ya que es aquí donde se transforman los Azúcares del Agave, en etanol y otros compuestos químicos, Dicha transformación es llevada a cabo por un consorcio microbiano integrado principalmente por levaduras y bacterias (López 2020).

1.1.3 Glucolisis

Espinosa (2013) menciona que en este proceso se convierte un mol de glucosa en dos moles de etanol, dos moles de dióxido de carbono y dos moles de ATP. La sacarosa, al ser un dímero de glucosa y fructosa, es primero hidrolizada por la enzima invertasa y posteriormente fermentada. Cada molécula de glucosa es convertida a dos moléculas de piruvato o ácido pirúvico en un proceso llamado glucólisis. El piruvato es transformado a acetaldehído mediante la enzima piruvato-descarboxilasa y el acetaldehído da paso a la formación de etanol mediante la enzima alcohol-deshidrogenasa. Como en la figura 2.

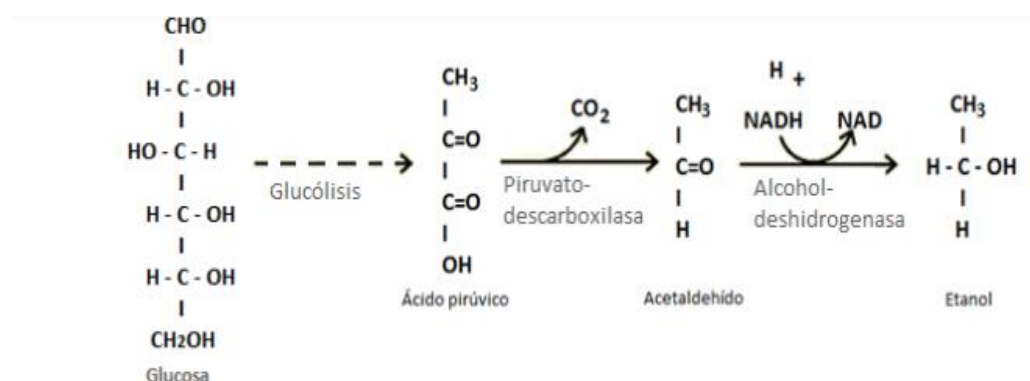


FIGURA 2. Fermentación alcohólica. Fuente: Espinosa (2013).

1.1.4 Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles tienen diferente origen, pueden estar contenidos en la materia prima y variar entre especies, regiones geográficas y entre condiciones climáticas de cultivo o pueden generarse durante la fermentación en función de la cepa, características del mosto y condiciones del proceso, o durante la maduración del producto (Pinal et al, 1997).

Dentro de estos compuestos se encuentran los alcoholes superiores, los acetales y los ésteres. Existen en la literatura diversos trabajos sobre los factores que influyen en la formación de compuestos organolépticos, sin embargo, en el caso del mezcal el conocimiento científico sobre este tema es incipiente y el resto de la información disponible se basa sobre la experiencia acumulada durante años por los productores de mezcal.

1.1.5 Microorganismos involucrados.

Las bebidas fermentadas que se producen de forma tradicional como el mezcal, se obtienen mediante fermentaciones espontáneas, es decir, no se añaden inóculos comerciales, sino que actúan los microorganismos naturales presentes en el sustrato. Durante este tipo de fermentaciones no se obtiene el producto de la acción de una única especie, ya que en ellas se llevan a cabo procesos bioquímicos muy complejos, en los que intervienen e interaccionan levaduras y bacterias (Torija, 2002).

El principal argumento a favor indica que en estas fermentaciones se consiguen características organolépticas típicas de la zona que no estarían presentes si se utilizara un inóculo de cepas foráneas. La composición cualitativa y cuantitativa de

la microbiota presente a lo largo de la fermentación del mosto puede depender principalmente de los siguientes factores: La región de origen de la materia prima, el procedimiento de producción, la temperatura y el pH, (Torija, 2002).

En estudios realizados por López 2020, se han encontrado en el mezcal levaduras del género *Saccharomyces*, existen otras levaduras no-*Saccharomyces* como *Candida*, *Kluyveromyces* y *Schizosaccharomyces*. En el caso de las bacterias ácido lácticas hasta el momento se ha encontrado tres géneros; *Lactobacillus*, *Weisella* y *Leuconostoc*.

1.2 Zymomona Mobilis.

Es una bacteria gran-negativa con una gran importancia en producción de biocombustible y la fermentación de alimentos dado su versatilidad para la producción de etanol metabolizando azúcares. (Kremer *et al.* 2015).

La mayor parte de las cepas pertenece a la subespecie mobilis. (Abarca 2010).

Algunas características fenotípicas del género *Zymomona* son:

1. Bastón gramnegativo de 1 a 5 μm de ancho y de 2 a 6 μm de largo.
2. Inmóvil o móvil debido a la presencia de 1 a 4 flagelos lofótricos.
3. Arreglo celular pleomórfico (cadenas, rosetas, filamentos).
4. Ausencia de esporas, de cápsulas y de constituyentes de almacenamiento celular.
5. Anaeróbico y microaerófilo.
8. Las únicas fuentes de carbono que metaboliza son: glucosa, fructosa y sacarosa.

Algunas de las características fundamentales de *Zymomona mobilis* para (Rogers *et al.* 2007) son presentadas en la siguiente tabla:

TABLA 1. Principales características de *Zymomona mobilis*.

Características de <i>Zymomona mobilis</i>.
1. Mayor velocidad específica de consumo de sustrato y de producción de etanol (Velocidad específica 2-3 veces mayor que las levaduras).
2. Alto rendimiento para el etanol y bajo para la biomasa comparado con las levaduras, debido a las diferencias en el metabolismo del carbono (Entner-Doudoroff Vs Glucolisis).
3. Mayores productividades reportadas ($120-200\text{ g/Lh}$) en procesos en continuo con reciclo celular (la máxima reportada para las levaduras es de $30-40\text{ g/Lh}$).
4. Condiciones simples de crecimiento, pues <i>Zymomonas mobilis</i> es anaerobia (pero no es estricta) y no requiere la adición controlada de oxígeno con el fin de mantener la viabilidad celular a altas concentraciones de etanol, como si pasa con las levaduras.
5. Tolerancia al etanol comparable o mayor que las levaduras. Se han reportado concentraciones de etanol de 85 g/L (11% v/v) para cultivo en continuo y de hasta 127 g/L (16% v/v) en cultivo Batch.
6. Estudios a escala de laboratorio con <i>Zymomonas mobilis</i> durante muchos años no han revelado problemas significativos de contaminación o problemas ocasionados por infección de bacteriófagos.
7. El amplio rango de técnicas de ingeniería genética desarrollados para las bacterias pueden ser utilizadas en <i>Zymomonas mobilis</i> con el fin de generar cepas recombinantes.

8. La secuencia completa del genoma de *Zymomonas mobilis* ZM4 provee nueva información para emplear la ingeniería metabólica con el fin de desarrollar productos adicionales de alto valor agregado (e. g. Succinato).

9. Uso potencial de las enzimas de *Zymomonas mobilis* en biotransformación química.

Fuente: Rogers *et. al* (2007).

1.2.1 Antecedentes

La bacteria en estudio fue aislada como contaminante durante la producción de sidra en 1912, su eficiencia para la producción de alcohol fue conocida desde 1913 gracias a los estudios de Kluyveri y Hoppenbrouwers. En 1934, Screder y sus colaboradores demostraron que cuando *Z. mobilis* era cultivada en presencia de glucosa, el 98% del sustrato era transformado en etanol y en CO_2 . A principios de los años 50 Gibbs y De Moss demostraron que la bacteria metabolizaba su sustrato por la vía de Entner-Doudoroff. No fue sino hasta los años 60 que la bacteria fue utilizada a nivel industrial para la producción de pulque, bebida alcohólica de origen mexicano (Balon 2009).

Debido a su morfología, y al hecho de metabolizar su sustrato por vía de Entner-Doudoroff, la bacteria ha sido clasificada dentro de la familia de las Pseudomonadaceae. Utilizando criterios taxonómicos relacionados con más de cuarenta cepas, Swings y De Ley propusieron una nueva clasificación que reagrupa a todas las cepas de *Zymomonas* en una especie (*Zymomonas mobilis*) y dos subespecies: *Zymomonas mobilis mobilis* y *Zymomonas mobilis pomaceae*. (Abarca 2010).

TABLA 2. Aislamientos previos de *Zymomonas mobilis* en agar WLD.

AUTOR	TITULO	METODOLOGIA	RESULTADOS
Cervantes et al., (2008).	Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman.	Para <i>Zymomonas sp</i> , se utilizó Agar WLD.	Colonias pequeñas, puntiformes traslucidas que se podrían asociar con <i>Zymomonas sp</i> .
Bayona Martin et al., (2001),	Determinación de bacterias contaminantes en el proceso de producción de alcohol etílico y su relación con la floculación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Utilización de Medio WLD.	Colonias redondas, bordes regulares, de color verde profundo, de 1-4 mm de diámetro. Tinción de Gram: bacilos gram negativos.
Maldonado et al., (2001).	Efecto antagónico de <i>Zymomonas mobilis</i> spp. frente a <i>Salmonella</i> sp.	Cinco cepas de <i>Z. mobilis</i> en agar WLD.	Colonias puntiformes, con bordes regulares, cremosas, convexas - lisas

	y <i>Proteus mirabilis</i> .		de color verde; presentando acidificación en el medio de cultivo.
--	------------------------------	--	---

1.2.2 Necesidades nutritivas

Es una bacteria quimiorganótrofa que presenta auxotrofia por el pantotenato de calcio y en algunos casos por la biotina. El nitrógeno necesario para el crecimiento puede proporcionarse por medio de la peptona, extracto de levadura y caldo nutritivo, sales minerales, aminoácidos o péptidos. (Balon 2009).

Los nitratos y nitritos no son asimilados por la bacteria. El azufre, magnesio y potasio son proporcionados en forma de sales. Los oligoelementos (Mo, Fe, Zn, Mn, etc.) necesarios al metabolismo de la bacteria se encuentra en estado de trazas en sales utilizadas para la preparación del medio de cultivo. (Abarca 2010).

Por otro lado, las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria *Z. mobilis* son las siguientes: requiere azúcares tales como glucosa, fructosa y sacarosa, es anaerobio facultativo, pH óptimo de 5 y temperatura óptima de 30°C. (Swings, *et al.* 1977).

1.2.3 Ruta metabólica

Zymomonas mobilis es una bacteria anaerobia que sólo metaboliza glucosa, fructosa y sacarosa a partir de la ruta de Entner-Doudoroff (Choi 2008).

Zymomonas mobilis es una bacteria predominante en las savias de maguey, es anaerobia facultativa y ha sido reportada como productora de etanol con

rendimientos de hasta cinco veces más que las levaduras por la vía Entner Doudoroff. (Nakamura 2008).

Posee una alta velocidad específica de consumo de glucosa, soporta altas concentraciones de glucosa y de etanol. Puede crecer con 400 g/l de glucosa inicial. (Davis 2006).

Existen cepas de *Z. mobilis* capaces de llevar a cabo la fermentación anaerobia de un azúcar como la xilosa a etanol a través de la combinación de las vías de las Pentosas fosfato y la de Entner-Doudoroff.(Zhang 1995).

Para esta bacteria la vía de Entner-Doudoroff es constitutiva y funciona anaeróbicamente. Esta vía también opera de manera lineal, pero a diferencia de las bacterias entéricas como *E. coli*, esta es la principal vía para el catabolismo de glucosa, fructosa y sacarosa, dando como productos etanol, ácido láctico y CO_2 . En cambio, la maltosa, lactosa, manosa, galactosa, arabinosa, dextrina y manitol no son fermentados por *Z. mobilis*. (Swings, et al. 1977).

Esta bacteria carece de la enzima gluconato-6-fosfato deshidrogenasa (vía de Pentosas fosfato) y tiene el ciclo de Krebs incompleto, por lo que la vía de Entner-Doudoroff aporta todos los precursores metabólicos necesarios para los procesos de biosíntesis y generación de energía (Conway 1992).

Z. mobilis a través de la vía de Entner-Doudoroff obtiene solo un mol de ATP por mol de glucosa fermentada. Esto hace que este organismo requiera un flujo de carbono rápido. El sistema de transporte de azúcares por difusión facilitada, acoplado a la alta expresión de los genes para las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasas permiten la conversión rápida y eficiente de glucosa a etanol (Ingram 1989).

El balance neto de la ruta es la formación de un mol de Adenosín trifosfato (ATP) y dos de etanol y dióxido de carbono por mol de glucosa o fructosa metabolizada, de

ahí que la formación de biomasa sea menor que en el caso de las levaduras (dos moles de ATP por mol de glucosa por la vía glicolítica), debido a una limitación en la disponibilidad de energía para los procesos de biosíntesis. (Brito *et Al.* 1999).

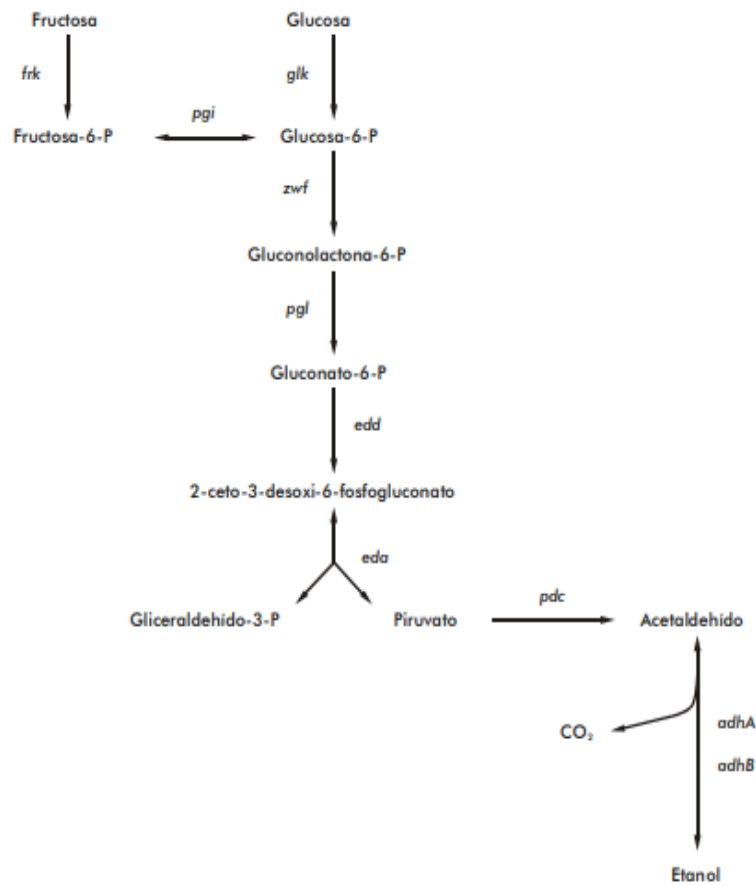


FIGURA 3. Vía lineal de Entner-Doudoroff en *Z. mobilis*. Fuente: (García 2003).

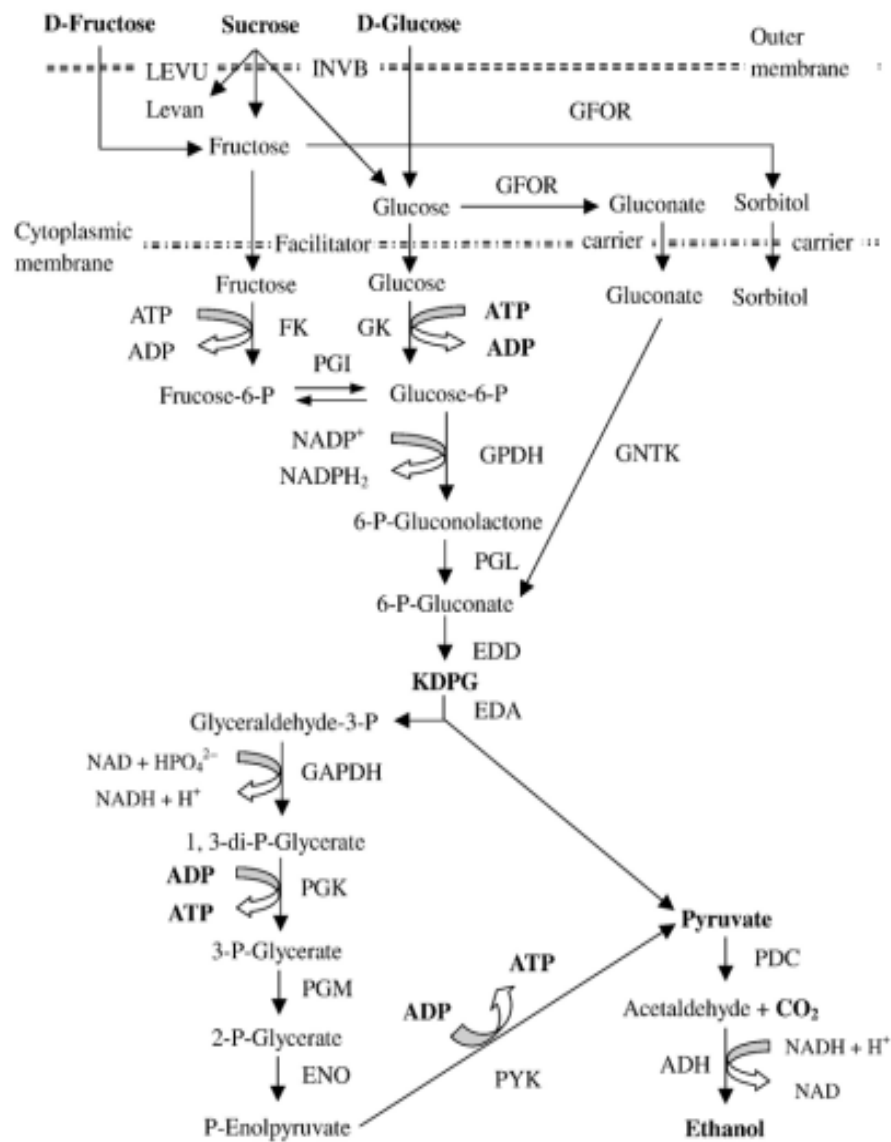


FIGURA 4. Ruta metabólica de fermentación de etanol (ED) en *Zymomonas mobilis*. Fuente: (Bai 2008).

1.2.4 Efecto de la temperatura.

Z. mobilis es capaz de crecer en una gama de temperaturas de 25 a 40°C, su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 35°C. A temperaturas superiores a 30°C, son los rendimientos de etanol y biomasa más que los parámetros específicos, quienes se ven más afectados. El crecimiento a 36°C es la mejor prueba fenotípica para diferenciar a *Z. mobilis* subespecie *mobilis* (+) de *Z. mobilis* subespecie *pomaceae* (-), *Zymomonas* es eliminada al exponerla a una temperatura de 60°C por 5 minutos (Balon 2009).

Contrariamente a *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* es incapaz de mantener constante la fluidez de la membrana al ser cultivada a diferentes temperaturas. A altas temperaturas la fluidez disminuye proporcionalmente a la concentración de ácidos grasos insaturados. El aumento de la temperatura induce la acumulación de etanol en el interior de las células, lo que amplifica su efecto inhibidor. Durante el cultivo de *Zymomonas mobilis* a 40°C, la adición de Mg²⁺ al medio de cultivo mejora en un 100% el rendimiento de producción de etanol (76% de rendimiento en lugar de 38%). (Abarca 2010).

1.2.5 Efecto del etanol.

La bacteria *Z. mobilis* presenta ventajas para llevar a cabo el proceso, destacándose entre otras por: (i) alta velocidad específica de consumo de sustrato y de producción de etanol, (ii) rendimientos de etanol cercanos a los máximos teóricos con relativamente baja formación de biomasa (iii) alta tolerancia al etanol hasta del 16% v/v (iv) la facilidad con la que se puede manipular genéticamente (Seo *et al.* 2005). *Z. mobilis* produce mayor rendimiento de etanol comparado con *S. cerevisiae* con valores de 0,49 y 0,46g/g respectivamente, en medio de cultivo con 100g/L de glucosa, 200rpm, pH 5 y 30°C. (Davis *et al.* 2006).

Además, produce menos biomasa comparada con otros microorganismos y más carbono es canalizado para la producción de etanol, obteniendo rendimientos y

productividades de etanol por arriba de 1.9 mol etanol/ mol glucosa, esto representa aproximadamente el 97% de la eficiencia de conversión teórica (Yanase *et al.* 2002).

Si bien la *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* son las mejores opciones para la producción de etanol a nivel industrial, resulta que esta última posee una alta tolerancia al etanol sin inhibición, mayores velocidades específicas de consumo de sustrato y producción de etanol, por lo tanto, tiene un mayor rendimiento de etanol producido por glucosa fermentada, cerca de 5 a 10 % con respecto a *Saccharomyces cerevisiae*. (Lee *et al.* 2000).

1.2.6 Efecto del pH.

Se ha encontrado que tiene cierto comportamiento de crecimiento a diferentes temperaturas y pH. Donde las cepas de *Zymomonas* anaerobias crecen en el rango de pH comprendido ente 3.4 a 7.5.(Swings, *et al.* 1977).

Esta bacteria crece en un rango de pH 3.5 – 7.0 (Garcia *et al.* 2004).

Además de poder crecer y producir etanol en un rango de pH de 3.5 a 7.5 (Panesar 2006).

En fermentación en medio líquido (FML) se ha reportado un pH de 5 y 3.5 al inicio y al final de la fermentación respectivamente (Kalneniek 2006).

1.3 Fermentación en medio estándar.

1.3.1 Crecimiento microbiano y preinóculo.

El crecimiento bacteriano inicia al inocular nutrientes con una pequeña cantidad de células. Durante el crecimiento bacteriano se identifican claramente cuatro fases.

Una fase de latencia en la cual los microorganismos se adaptan al medio en el cual iniciarán la fase de crecimiento exponencial, durante esta fase el crecimiento bacteriano es máxima y es la más importante durante todo el proceso de producción. Al presentarse un agotamiento de los nutrientes iniciales se inicia una fase estacionaria donde los microorganismos limitan su crecimiento y posteriormente entran a la fase de muerte.

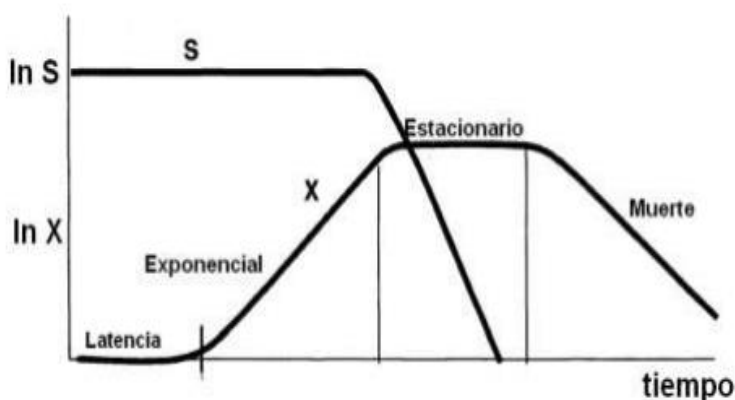


FIGURA 5. Concentración de biomasa y sustrato. Fuente: Dunn 2003.

Otro factor de suma importancia en la fermentación de azúcares con *Z. mobilis* es la preparación del preinóculo e inóculo, esto quiere decir que para obtener rendimientos altos de etanol se debe utilizar un inóculo adaptado a el medio de cultivo y a las condiciones de temperatura, pH y agitación a las que se llevará a cabo la fermentación. (Doelle 1993),

La cinética de crecimiento es evaluada por densidad óptica a 540 nm cada 2 horas, mostrando un período de adaptación rápido, seguido por un período pronunciado de crecimiento exponencial de la hora 6 hasta la hora 26. La fase estacionaria se desarrolló de la hora 26 a la 32 con una $m = 0.20 \text{ h}^{-1}$, para luego continuar con la fase de declinación o muerte. La cinética de crecimiento de *Zmm1* muestra una fase de adaptación corta; de la hora 2 a la 29 se mantuvo la fase de aceleración logarítmica, hasta alcanzar la fase estacionaria a la hora 32 con una $m = 0.18 \text{ h}^{-1}$;;

posteriormente llegó a la fase de muerte. La cepa *Zmm2* mostró una fase de adaptación rápida. La fase exponencial demostró que de la hora 2 a la 12 el crecimiento es lento, pero de la hora 12 a la 23 ocurre un incremento del crecimiento alcanzando la fase estacionaria con una $m = 0.15 \text{ h}^{-1}$, para luego continuar con la fase de declinación. La cinética de crecimiento de *Zmp1* presentó un periodo de adaptación corto, una fase logarítmica larga hasta la hora 17 con $m = 5 \text{ h}^{-1}$; la fase estacionaria se extendió desde la hora 26 a la 32 se. *Zmp2* presentó una fase de adaptación corta, una fase logarítmica constante con un máximo de crecimiento a la hora 26 con una $m = 35.7 \text{ h}^{-1}$,. (Maldonado 2001).

1.4 Aplicaciones industriales.

Zymomonas mobilis interviene en la fermentación del vino de palma, de la cerveza chica, así como en la fabricación del vino. Se asegura, además, que participaba en la fabricación de las cervezas auténticas de la antigüedad. También se ha utilizado para la conservación de jugos extraídos de remolacha y en el tratamiento de desechos de la industria cervecera para uso como alimento en animales de granja (un uso parecido se ha producido con la papa). Otro uso dado ha sido para la elaboración de cervezas con bajo contenido de alcohol (0,7%), a esta se la llama “cerveza dietética”. También ha sido empleada para desarrollar una nueva tecnología en la producción del “pulque”. Otra posibilidad de utilización de *Zymomonas mobilis* es la producción a gran escala de etanol. Esto debido a que su rendimiento de conversión es mayor que el de la levadura y a que puede producirlo a una velocidad significativamente más elevada, además, esta bacteria no necesita oxígeno y presenta en general una mejor tolerancia al etanol que la levadura. (Abarca 2010).

El bioetanol es uno de los combustibles renovables más importantes que contribuyen a la reducción de los impactos ambientales negativos. La producción de bioetanol utilizando materias primas de grado alimenticio no resulta factible, por

lo cual el residuo celulósico es una alternativa bastante atractiva debido a que es abundante y barata, siendo *Z. mobilis* una bacteria de interés. (Morales 2011).

Un factor importante en la fermentación es el microorganismo utilizado. Dos de los principales microorganismos que se usan en la producción de etanol son *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. Debido a que *Z. mobilis* es una bacteria osmo y etanol tolerante su uso en la industria de los biocombustibles (bioetanol) ha ido creciendo considerablemente. (Alarcón 2010).

Dentro de los microorganismos de interés como alternativa en producción de bioetanol, se encuentra *Zymomonas mobilis* (Zm), quien, por su consumo rápido de glucosa en procesos de fermentación y bajas de pH en el medio, han despertado interés desde la década de los 30. (Matiz 2002).

CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Muestreo.

- San Pedro Teozacoalco:

Se obtuvieron 4 muestras al azar en botellas estériles de los mostos de fermentación del proceso de producción de mezcal del tipo artesanal del palenque ubicado en San Pedro Teozacoalco, Oaxaca de Juárez (Latitud: 17.0201, Longitud: -97.2857, 17° 1' 12" Norte, 97° 17' 9" Oeste) de dos especies diferentes: a) *A. potatorum* Zucc.; 3 días de fermentación, pH 3.5 y 3.9 °Brix, y b) *A. angustifolia* Haw; 3 y 2 días de fermentación, pH 4.5 y 20 °Brix.

- Miahuatlán de Porfirio Diaz

Se obtuvo una muestra al azar en botellas estériles del mosto de fermentación del proceso de producción de mezcal del tipo artesanal del palenque ubicado en San Luis Amatlán Miahuatlán Porfirio Diaz, Oaxaca, (Latitud: 16.47161 Longitud: -96.73210,) de una especie: c) *Agave karwinskii* con 6 días de fermentación, pH 5.0 y 30°Brix.

2.2 Aislamiento.

La técnica para el aislamiento fue el de diluciones seriadas en agua peptonada estéril al 1% tomando de las diluciones 1×10^{-2} y 1×10^{-3} , 50 μ l para siembra en cajas Petri en el medio de crecimiento agar WLD. Las cajas se incubaron a 35 °C por 3 días en una incubadora marca ECOSHEL modelo 9052L y se seleccionaron las cepas que por morfología macroscópica observada en un microscopio estereoscópico SWIFT MA725 presentaran las características siguientes: colonias

redondas, bordes regulares y de color verde profundo. Cada colonia se sembró nuevamente en el medio WLD por técnica de estría cruzada en cuatro cuadrantes por agotamiento hasta obtener cultivo axénico.

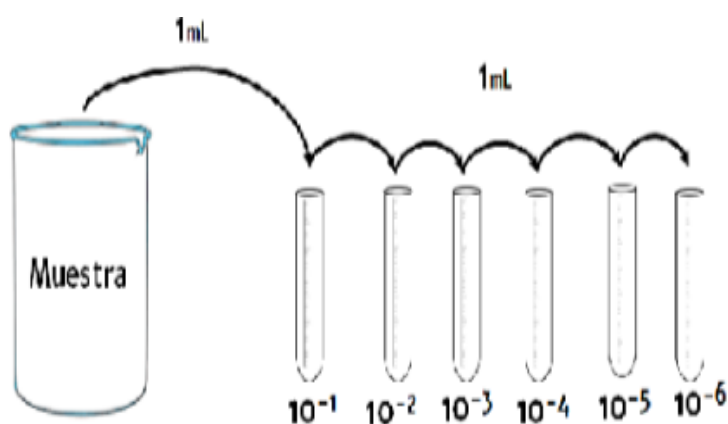


FIGURA 6. Método de Diluciones.

2.3 Siembra en medio selectivo.

Se sembraron en el medio selectivo WLD (Bayona et al., 2002) y se incubaron a 35°C por 3 días, aquellas cepas que perduraron se consideraron como presuntivamente cepas de *Zymomona mobilis*.

TABLA 3. Cantidades para preparación de WLD.

	g/L	g/240mL	
Sabouraud dextrosa agar + Cicloheximida	65.4	15.696	
Extracto de levadura	4	0.96	
Fosfato de monopotasio	0.55	0.132	
Cloruro de potasio	0.425	0.102	
Dextrosa	10	2.4	
Gelatina bacteriológica	14	3.36	
Soluciones madre			mL/240mL
Cloruro férrico	0.0025	0.0006	2.4
Verde de bromocresol	0.125	0.03	
Cloruro de calcio + sulfato de magnesio	0.22	0.0528	24

Fuente: Abarca (2010).

2.4 Morfología microscópica.

Se realizó en un microscopio óptico marca Brand VELABTM, Modelo VE-B10; mediante tinción Gram; diferenciando las cepas que no presentaran las

características propias del género *Zymomona* (Cervantes-Contreras y Pedroza, 2008).

2.5 Pruebas Bioquímicas.

Las cepas seleccionadas se realizan las pruebas correspondientes como mencionan, Abarca (2010), Bayona (2001).

TABLA 4. Pruebas Bioquímicas para *Zymomona mobilis*.

	PRUEBA	MEDIO
1	Crecimiento en agar EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
2	Citrato	Agar citrato de Simmons
3	TSI	Agar hierro y triple azúcar
4a	Ureasa	Caldo Urea
4b		Base de agar urea + agar
5	Gelatinasa	Gelatina bacteriológica + grenetina + NaCl
6	D – Glucosa	Caldo base rojo de fenol + azúcar
7	Sacarosa	
8	Lactosa	
9	Medio estándar + NaCl	Agar para métodos estándar + NaCl (0.5%)
10	Movilidad	Agar + glucosa

Fuente: Bayona (2001), Abarca (2010).

2.6 Prueba de fermentación en medio estándar WL.

Se realizaron preinóculos en medio líquido WL modificando la fuente de carbono, se emplearon 3 fuentes de carbono: dextrosa, fructosa y sacarosa a 70 g/L, se emplearon estos debido a que son los azúcares mayoritarios presentes en los mostos de agave. Se realizó un preinóculo adicionando 2 colonias dejándolo por 72 h de incubación a 35°C (Lyness y Doelle 1980), hasta obtener 1×10^6 UFC/mL en escala McFarland a 600 nm. Se realizó una cinética de tipo destructiva con la finalidad de mantener volumen constante, por un total de 5 días de fermentación. Se tomaron muestras para ART (Dubois et al., 1951; Dubois et al., 1956); Biomasa (Arnáiz et al., 2000) y UFC/mL (McFarland, 1907; Li et al., 1993).

TABLA 5. Componentes del medio estándar para prueba de fermentación, variando fuente de carbono.

g/l	
Extracto de levadura	4
Fosfato de monopotasio	0.55
Cloruro de potasio	0.425
Dextrosa Sacarosa Fructosa.	30
	Solución madre (para 100 ml)
Cloruro de calcio + sulfato de magnesio.	10 ml

Fuente: propia.

2.7 Fermentación en *Agave angustifolia* Haw.

Se realizó un preinóculo en mosto de *Agave angustifolia* Haw (ya que es el más común y más fácil de conseguir), en relación 1:3 (agave cocido: agua) colocando 2 colonias del microorganismo de estudio e incubando por 72 h a 35°C (Lyness y Doelle 1980), hasta obtener 9×10^6 UFC/mL en escala McFarland a 600 nm. Se realizó una cinética de tipo destructiva con la finalidad de mantener volumen constante, por un total de 5 días de fermentación. Se tomaron muestras para ART (Dubois et al., 1951; Dubois et al., 1956); Biomasa (Arnáiz et al., 2000) y UFC/mL (McFarland, 1907; Li et al., 1993).

2.8 Destilación simple.

Se realizó una destilación simple del mosto fermentación en *Agave angustifolia* utilizando el equipo correspondiente.

2.9 Método de Dubois.

Existe una variedad de métodos colorimétricos los cuales utilizan reactivos distintos como antrona, fenol, orcinol o resorcinol- El método colorimétrico para la determinación de la concentración de carbohidratos más ampliamente utilizado es el desarrollado por Dubois et al. debido a la facilidad del procedimiento, sensibilidad, rapidez de los resultados y por ser apropiado para cuantificar diferentes azúcares como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. (Monsigny, 1988).

El método de Dubois et al. demostró ser simple, estable y reproducible, logrando acortar el tiempo necesario para la determinación de carbohidratos comparado con otros métodos colorimétricos. (Masuko 2005, Albalasmeh 2013, Hall 2013).

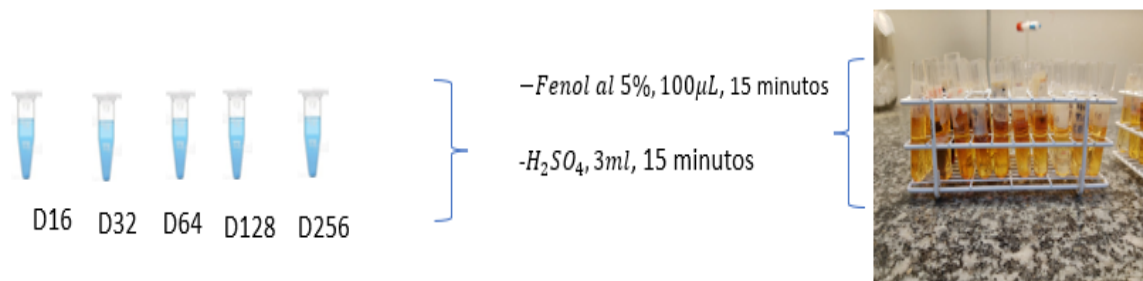


FIGURA 7. Método de Dubois et al. Fuente: propia.

2.10 Método por peso seco

La cantidad total de biomasa presente en una muestra puede medirse en términos de peso seco por unidad de volumen, ya sea como sólidos en suspensión totales (SST) o sólidos en suspensión volátiles (SSV). Las células se separan del líquido bien por centrifugación bien por filtración. La principal desventaja de estas técnicas es que su determinación incluye no sólo microorganismos activos sino microorganismos muer-tos, material inerte, polímeros extracelulares y materia orgánica adsorbida. (Arnáiz et al., 2000).

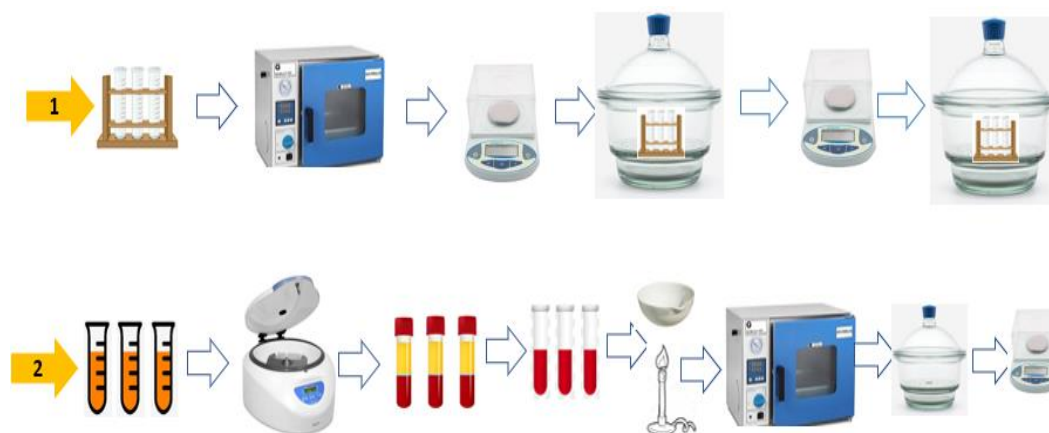


FIGURA 8. Método por peso seco. Fuente: propia

2.11 UFC/ml (Escala McFarland).

La escala de McFarland, ampliamente conocida en la estimación de poblaciones bacterianas aerobias, fue validada como técnica de estimación de bacterias anaerobias. En los laboratorios de microbiología clínica con énfasis en aerobios, se han superado estas dificultades, usando el estándar de McFarland,, que estima poblaciones microbiales comparando índices de turbidez del estándar con los logrados del cultivo microbiano.

Con el estándar de McFarland, es posible determinar la concentración bacteriana óptima para el proceso de criopreservación, cuando se lleva a cabo al final de crecimiento exponencial y principio de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. Además, la escala de McFarland, es una herramienta útil para evaluar la viabilidad bacteriana después del proceso de criopreservación. El método validado es efectivo para ser usado en otros procedimientos que requieran la estimación de concentraciones bacterianas, facilita la preparación de inóculos con poblaciones estimadas y demostró ser un método rápido, confiable y económico. (Arcos et al. 2004).

2.12 Modelo para determinación de parámetros cinéticos.

El modelo propuesto por Lee & Rogers (1983) presenta la desventaja de que algunos de los parámetros del modelo se determinan con base en estudios para levaduras, de los cuales los autores adoptan algunos datos para *Z. mobilis*. Por otra parte, algunos parámetros se determinan sin emplear herramientas matemáticas que permitan seleccionar verdaderamente los valores que mejor se ajustan a los resultados experimentales. Adicionalmente las ecuaciones propuestas de Lee & Rogers surgen simplemente de proponer ecuaciones tipo Monod para la cinética y adicionar términos con el fin de considerar el efecto inhibitorio del etanol y de la glucosa a altas concentraciones, sobre la formación de biomasa y producto en *Z. mobilis*. Por lo tanto, las ecuaciones obtenidas no reflejan los hallazgos experimentales alcanzados en *Z. mobilis*, lo cual limita la utilidad y capacidad

descriptiva del modelo. Una mejor estrategia es proponer ecuaciones con base en un análisis de la ruta metabólica empleada por *Z. mobilis* y en los resultados experimentales de diversas investigaciones, de forma tal que el modelo así obtenido constituya una síntesis de estos hallazgos.

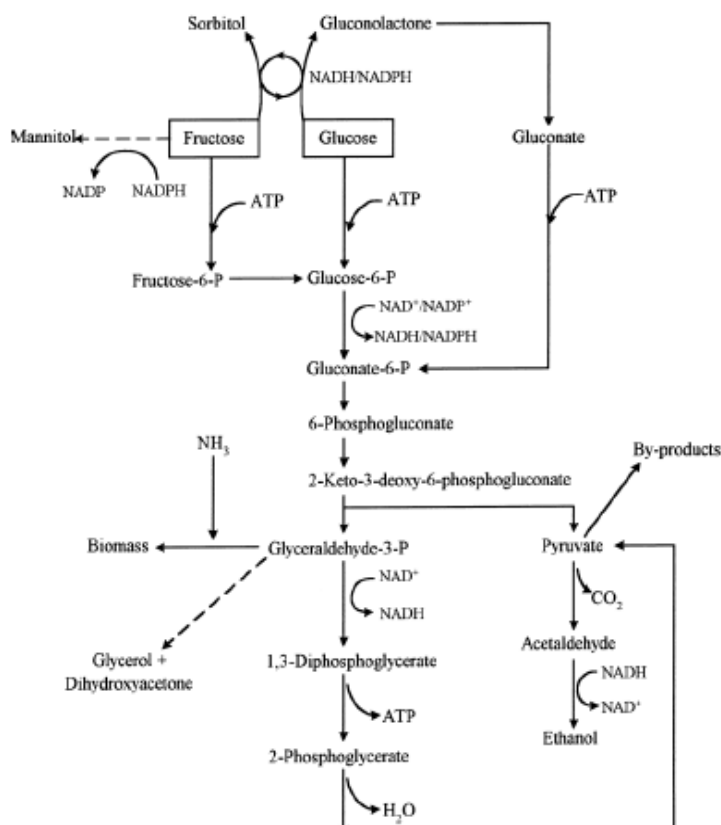


FIGURA 9. Metabolismo de la glucosa y fructosa en *Z. mobilis*. Fuente: (Lee & Huang 2000).

Lee & Huang (2000) proponen una forma novedosa de determinar la velocidad específica de consumo de sustrato, estos autores llevan a cabo un análisis de la ruta metabólica empleada por *Z. mobilis* para consumir glucosa y formar etanol, ATP y biomasa. Este análisis lo llevan a cabo empleando la figura 5, la cual indica que en ausencia de fructosa el catabolismo de la glucosa es a través de la vía glucosa-6-fosfato para convertirse en 6-fosfogluconato (6-FG). A través del intermediario 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, el 6-fosfogluconato se rompe para formar 2 moléculas de tres carbonos. Si no se emplea sustrato para formar biomasa, 2 moles de piruvato y 1 mol de ATP son producidas. El piruvato luego se convierte en etanol y dióxido de carbono, con la subsecuente regeneración del cofactor NAD⁺.

Para desarrollar el modelo que se propone en este trabajo se parte del modelo reportado por Rogers y col. (1999) y Leksawasdi y col. (2001). Este modelo incluye en su cinética tres parámetros que afectan sensiblemente el proceso de fermentación tasa específica de crecimiento, μ ; tasa específica de consumo de sustrato, q_s y tasa específica de producción de etanol q_p . Para incluir el efecto del pH en el modelo, se modificaron dichos parámetros como se muestra en las ecuaciones del 1 al 3.

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s \left(1 + \frac{H_i}{K_b}\right) + S} \quad (1)$$

$$q_p = \frac{q_{p max} S}{K_s \left(1 + \frac{H_i}{K_b}\right) + S} \quad (2)$$

$$q_s = \frac{\mu_s max S}{K_s \left(1 + \frac{H_i}{K_b}\right) + S} \quad (3)$$

Tasa específica de crecimiento (μ_x) en la fase exponencial de crecimiento, el cual será aproximadamente igual a μ_{max} .

$$x = x_0 x e^{\mu x t} \quad (4)$$

μ es constante cuando se encuentra en la fase de crecimiento exponencial, por tanto, la ecuación se puede integrar.

$$\ln x = \ln x_0 + \mu x t \quad (5)$$

Donde:

x = concentración celular en el tiempo (t)

x_0 = concentración celular en el tiempo ($t = 0$)

μ = tasa específica de crecimiento celular. Considerada μ_{max} en fase de crecimiento exponencial.

2.13 Modelo de Gompertz.

La ecuación diferencial de Gompertz viene dada por la siguiente expresión:

$$\frac{dN(t)}{dt} = KN(t) \ln \left(\frac{A}{N(t)} \right) \quad (6)$$

que incluye los mismos parámetros biológicos que el modelo logístico, la tasa intrínseca de crecimiento K y A como el crecimiento máximo. La tasa de crecimiento del modelo, definida como:

$$\text{Tasa de crecimiento} = K \ln \left(\frac{A}{N(t)} \right)$$

es, por tanto, de orden logarítmico. La ecuación diferencial de Gompertz puede resolverse explícitamente y sus soluciones son:

$$N(t) = Ae^{-Be^{-kt}}$$

donde:

- $N(t)$ es el tamaño de la población al tiempo t .
- A es el valor del máximo crecimiento y además determina un punto de inflexión en $\frac{A}{e}$.
- B número positivo que desplaza el modelo a la izquierda o derecha.
- K establece la tasa intrínseca de crecimiento.

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Pruebas Bioquímicas.

De las cepas seleccionadas como posibles candidatas de todas las muestras analizadas, solo una muestra cumplió con los resultados esperados para *Zymomona mobilis*, como menciona Abarca(2010) y Bayona (2001). Esta muestra fue la de *Agave potatorum* Zucc con 3 días de fermentación, pH 3.5 y 3.9 °Brix.

TABLA 6. Resultados de las pruebas bioquímica.

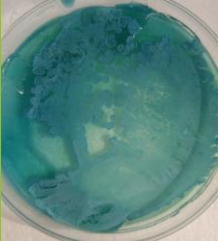
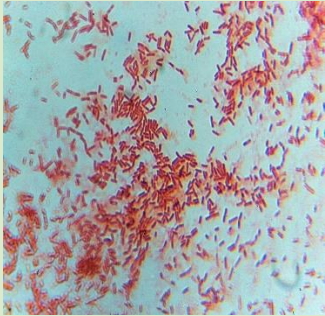
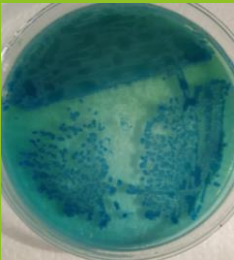
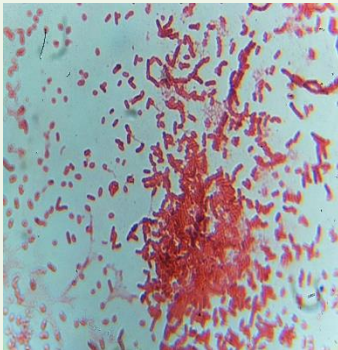
Prueba	Nombre de la Prueba	Resultado esperado	Resultados obtenidos			
			<i>Agave potatorum</i>		<i>Agave karwinskii</i>	
			1	4	1	3
1	Crecimiento en agar eosina azul de metileno	-	-	-	-	-
2	Prueba del Citrato	-	-	-	-	-
3	TSI (Agar Hierro Triple Azúcar)	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
4a	Caldo Urea	+	-	+	-	-
4b	Agar Urea	+	-	+	-	-

5	Prueba de Licuefacción de la Gelatina	-	-	-	-	-
6	D-Glucosa	+	+	+	+	+
7	Sacarosa	+	+	+	+	+
8	Lactosa	-	-	-	+	-
9	Crecimiento en medio estándar + NaCl	+	+	+	+	-
10	Movilidad	-	-	-	-	-
11.	Medio para detección de Zymomonas	+	-	+	-	-

La cepa de *Zymomona* descubierta se nombró bajo un sistema de códigos del laboratorio, siendo esta la *ITOLIV013* y una cepa previamente aislada como *ITOLIV012*.

En la siguiente tabla se muestra su imagen microscópica correspondiente a *Zymomona mobilis*, así como su cultivo axénico en la caja Petri.

TABLA 7. ITOLIV012 Y ITOLIV013.

<i>Zymomona mobilis</i>	Características	Imagen Microscópica	Características
ITOLIV012 	colonias pequeñas, puntiiformes traslucidas. Cervantes et al., (2008).		Bacilos Gram(-)
ITOLIV013 	colonias pequeñas, puntiiformes traslucidas Cervantes et al., (2008).		Bacilos Gram(-)

3.2 Cinética de Crecimiento en medio estándar.

3.2.1 Crecimiento celular de *Zymomona mobilis* ITOLIV012 y ITOLIV013 en Dextrosa, Sacarosa, Fructosa.

- **ITOLIV012**

Como se observa en la figura 10 se alcanzó la mayor cantidad de células a las 24 hrs usando sacarosa como fuente de carbono.

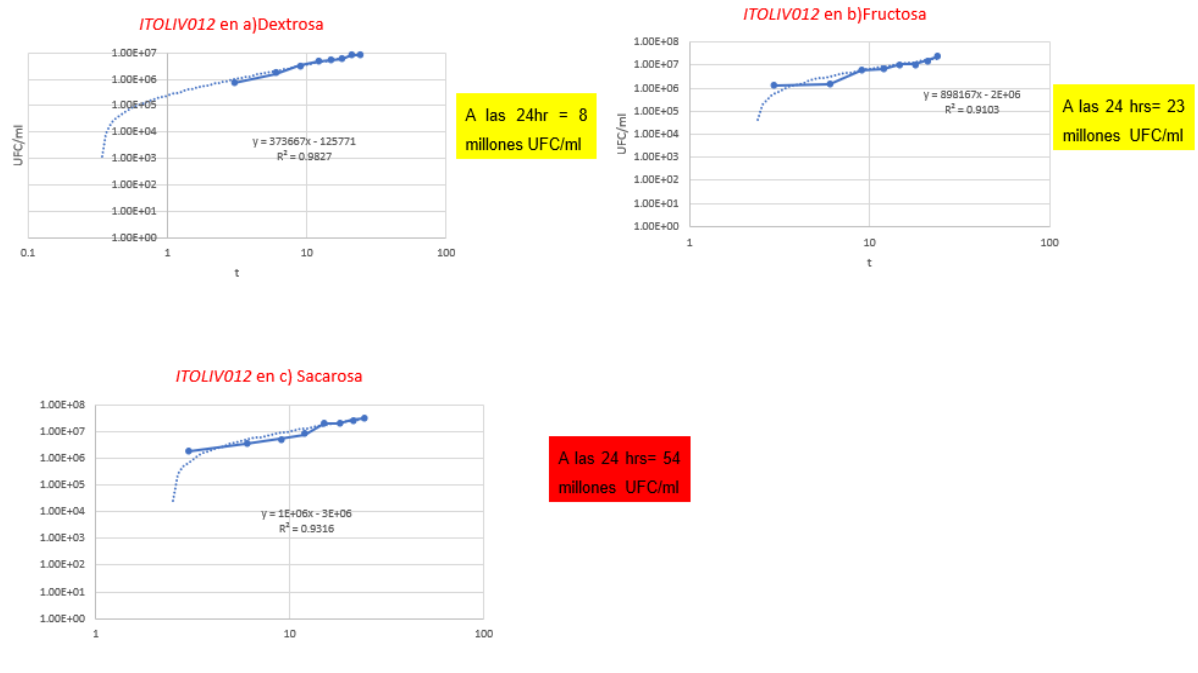


FIGURA 10. Crecimiento celular ITOLIV012 en a), b) y c) a las 24 hrs.

- ITOLIV013.

Como se observa en la figura 11 se alcanzó la mayor cantidad de células a las 24 hrs usando sacarosa como fuente de carbono.

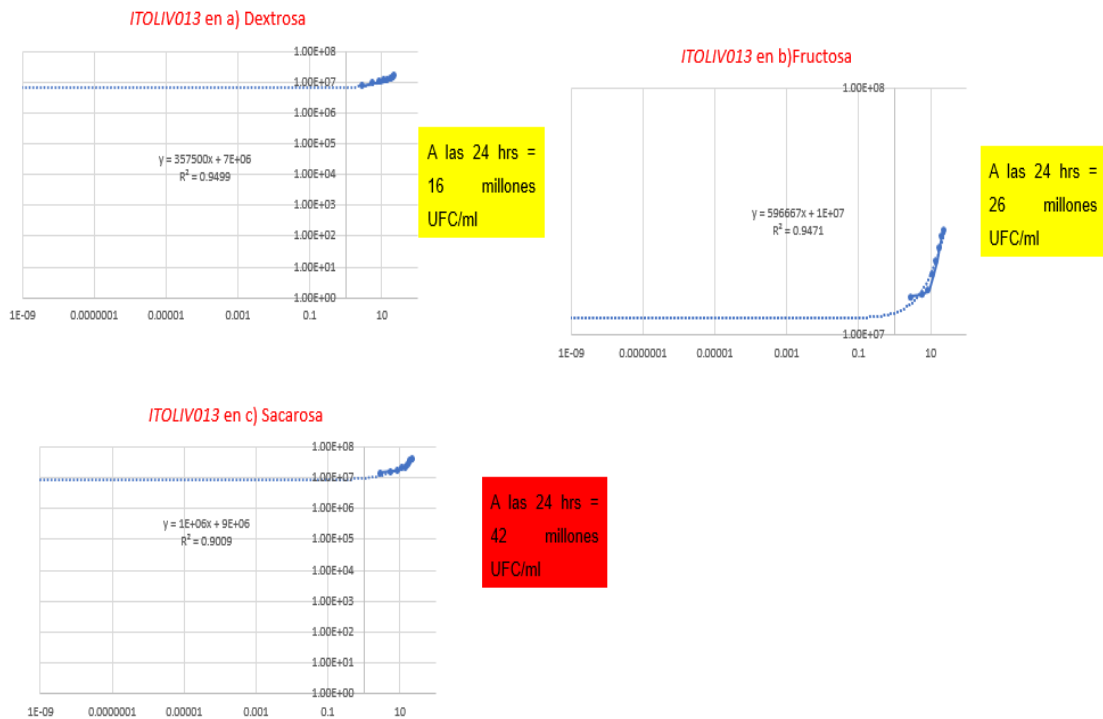


FIGURA 11. Crecimiento celular ITOLIV013 en a), b) y c) a las 24 hrs.

3.2.2 Generacion de Biomasa

3.2.2.1 Generación de Biomasa por las cepas ITOLIV012 Y ITOLIV013, en Dextrosa, Sacarosa y Fructosa

- ITOLIV012.

Como se observa en la figura 12 se alcanzó la mayor cantidad de biomasa a las 24 hrs usando sacarosa como fuente de carbono.

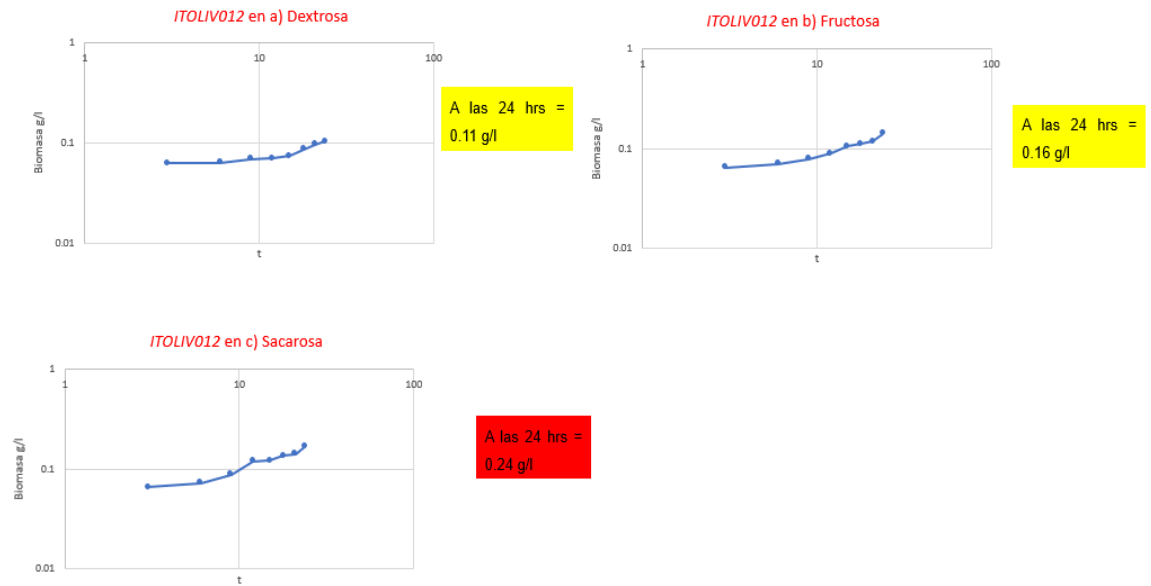


FIGURA 12. Generación de biomasa ITOLIV012 en a), b) y c) a las 24 hrs

- ITOLIV013

Como se observa en la figura 13 se alcanzó la mayor cantidad de biomasa a las 24 hrs usando sacarosa como fuente de carbono.

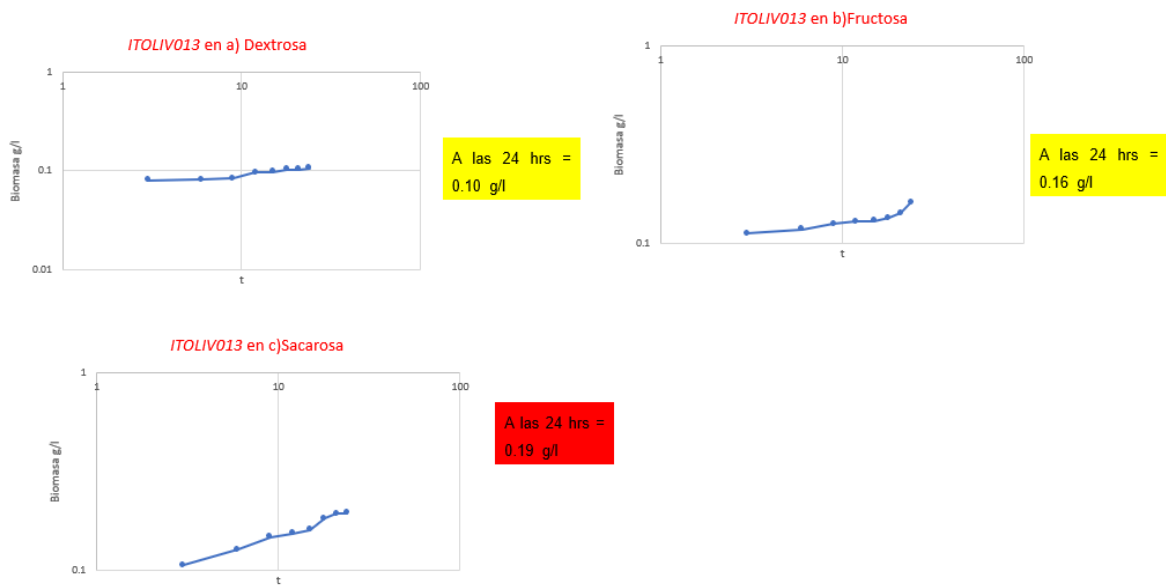


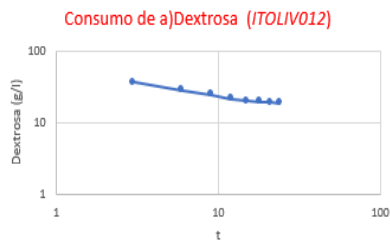
FIGURA 13. Generación de biomasa ITOLIV013 en a), b) y c) a las 24 hrs

3.2.3 Consumo de sustrato y formación de producto.

3.2.3.1 Consumo de Sustrato (Dextrosa, Sacarosa y Fructosa) por las cepas ITOLIV012 Y ITOLIV013

- **ITOLIV012**

Como se observa en la figura 14 donde más consumo de sustrato a las 24 hrs fue en sacarosa como fuente de carbono.



A las 24 hrs= 18.58 g/l



A las 24 hrs= 12.38 g/l



A las 24 hrs= 10.15 g/l

FIGURA 14. Consumo de sustrato por ITOLIV012 en a), b) y c) a las 24 hrs

• ITOLIV013

Como se observa en la figura 15 donde más consumo de sustrato a las 24 hrs fue en dextrosa, seguido de sacarosa por una diferencia menor.

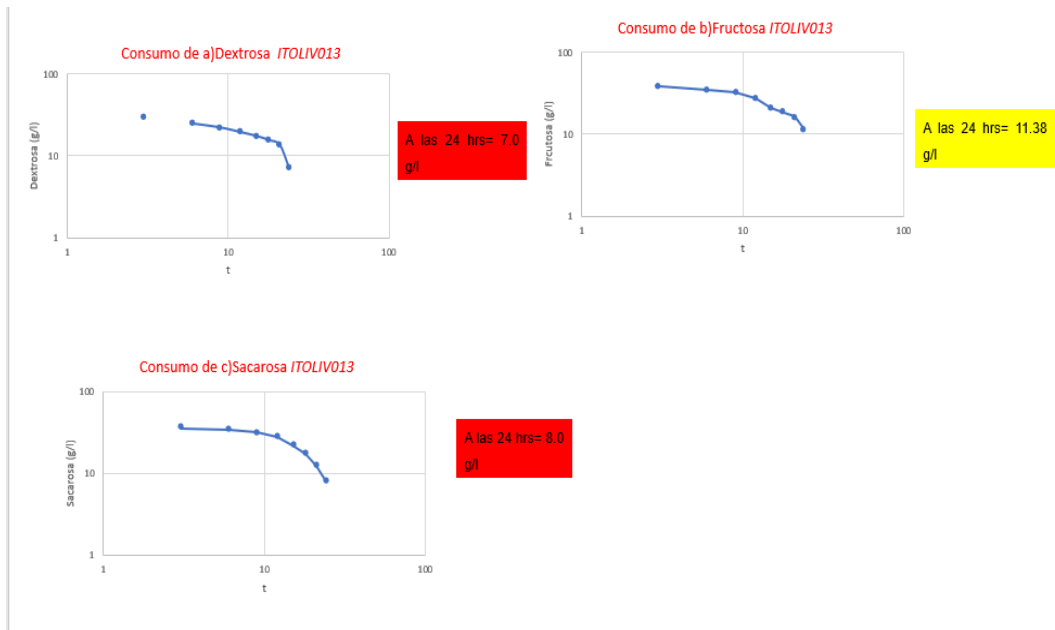


FIGURA 15. Consumo de sustrato por ITOLIV013 en a), b) y c) a las 24 hrs

3.2.3.2 Formación de Producto.

- ITOLIV012

Formula = $0.4(x \text{ gramos de sustrato})$
/1 gr de sustrato

Como se observa en la figura 16 donde mayor cantidad de etanol teórico produjo fue en sacarosa usada como fuente de carbono.

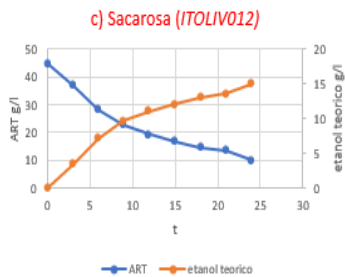
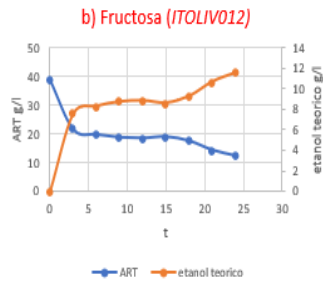
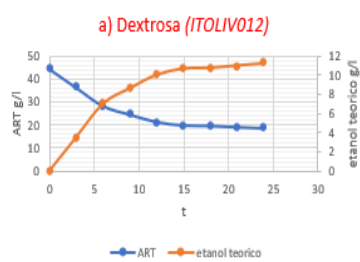


FIGURA 16. Consumo de sustrato por ITOLIV012 en a), b) y c) a las 24 hrs.

- ITOLIV013

Como se observa en la figura 17 donde mayor cantidad de etanol teórico produjo fue en dextrosa seguida de sacarosa, casi la misma cantidad.

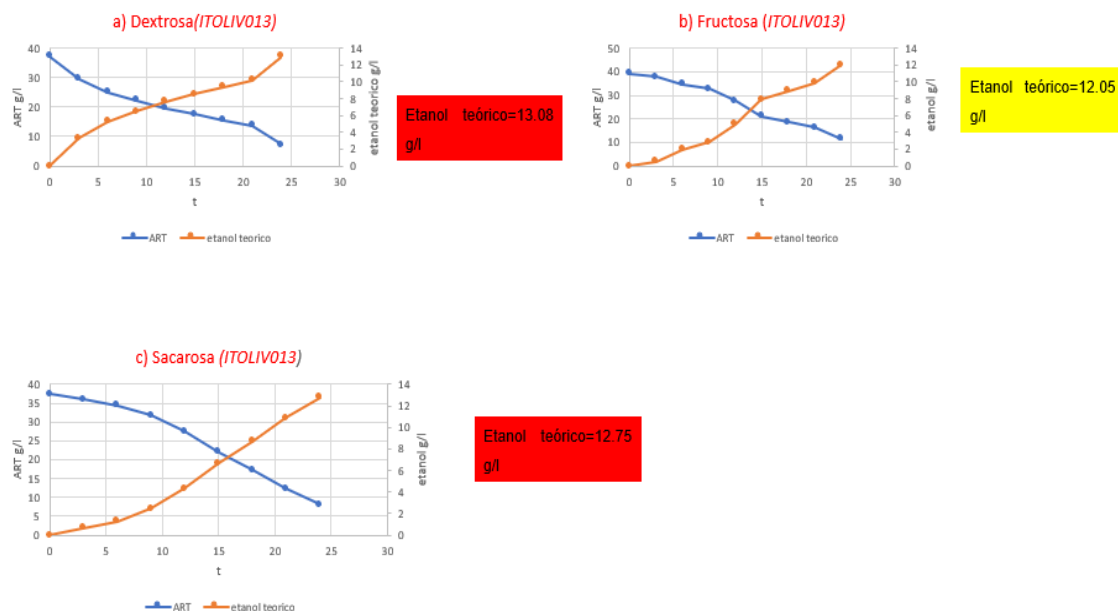


FIGURA 17. Consumo de sustrato por ITOLIV013 en a), b) y c) a las 24 hrs.

3.3 Cinética de crecimiento en mosto de *Agave angustifolia* Haw.

3.3.1 Crecimiento celular en mosto de *Agave angustifolia* Haw de ITOLIV012 Y ITOLIV013.

Como se observa en la figura 18 la cepa ITOLIV012 alcanzó la mayor cantidad de células a las 264 hrs en mosto de *Agave angustifolia* Haw usada como fuente de carbono.

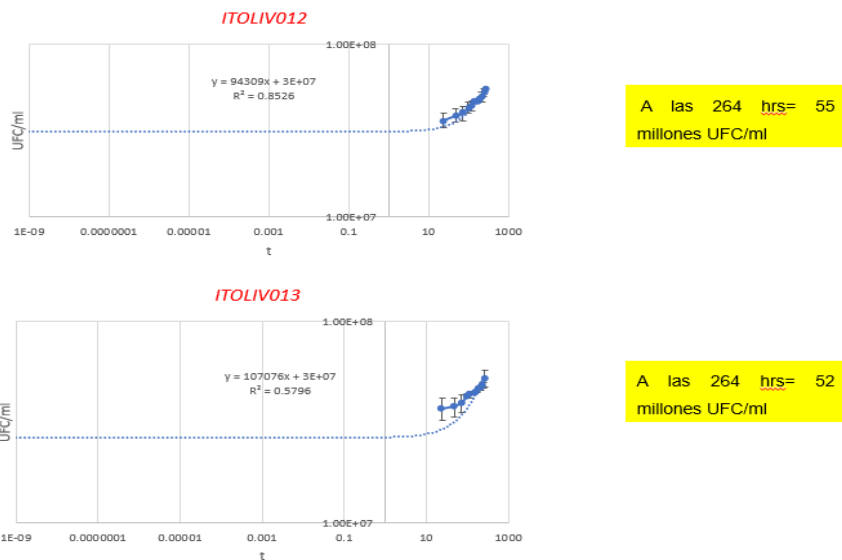


FIGURA 18. Crecimiento celular ITOLIV012 y ITOLIV013 en mosto de *Agave angustifolia* Haw a las 264 hrs.

3.3.2 Generación de Biomasa.

3.3.2.1 Generación de Biomasa por las cepas ITOLIV012 Y ITOLIV013, en mosto de *Agave angustifolia* Haw.

Como se observa en la figura 19 la cepa ITOLIV012 generó mayor cantidad de biomasa a las 264 hrs en mosto de *Agave angustifolia* Haw usada como fuente de carbono.

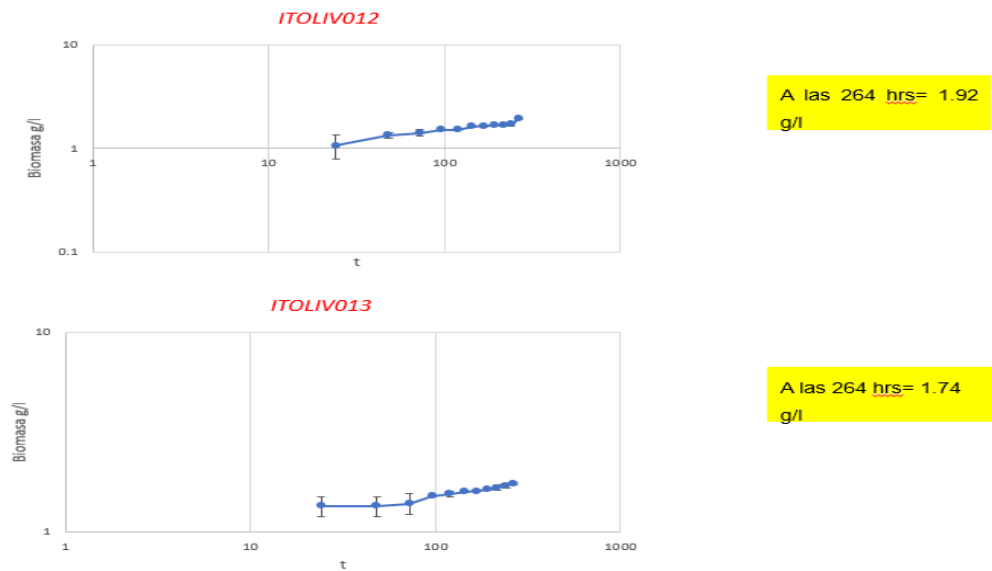


FIGURA 19. Generación de Biomasa por ITOLIV012 Y ITOLIV013 en mosto de *Agave angustifolia* Haw a las 264 hrs.

3.3.3 Consumo de Sustrato y formación de producto

3.3.3.1 Consumo de sustrato en *Agave angustifolia* Haw por ITOLIV012 Y ITOLIV013.

Como se observa en la figura 20 la cepa ITOLIV012 y ITOLIV013 consumieron casi la misma cantidad de sustrato en mosto de *Agave angustifolia* Haw usada como fuente de carbono a las 264 hrs.

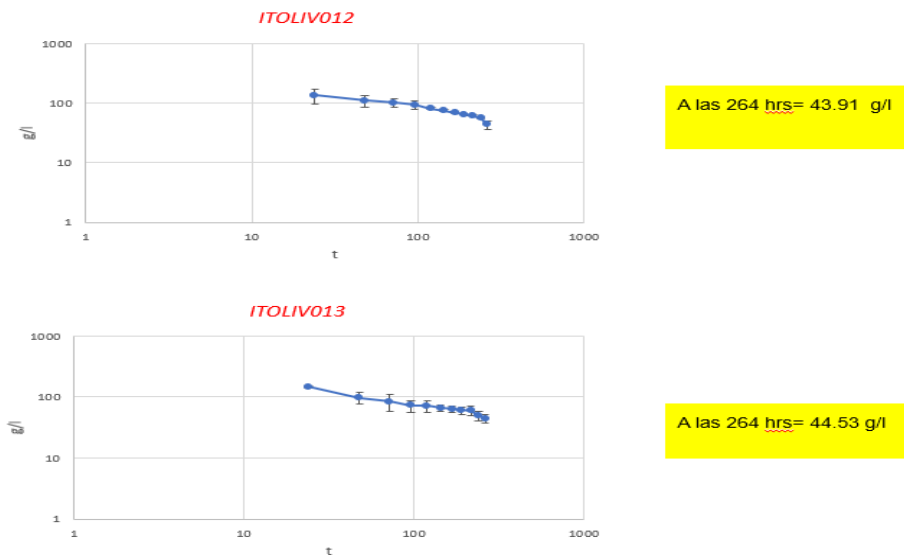
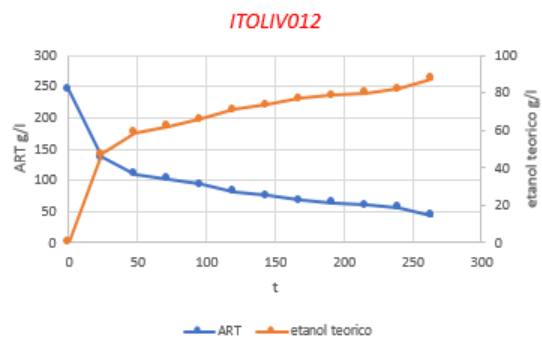


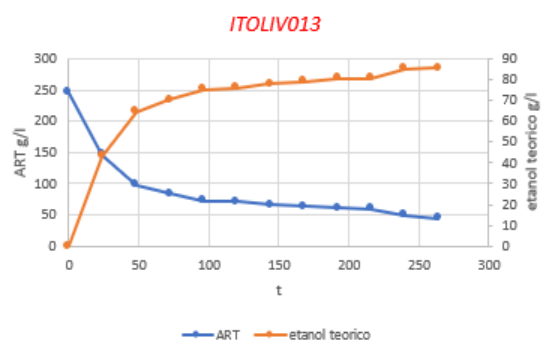
FIGURA 20. Consumo de sustrato en agave *Angustifolia Haw* por ITOLIV012 y ITOLIV013 a las 264 hrs.

3.3.3.2 Formación de producto.

Como se observa en la figura 21 la cepa *ITOLIV012* generó mayor cantidad de etanol teórico a las 264 hrs en mosto de *Agave angustifolia Haw* usada como fuente de carbono, con poca diferencia de la cepa *ITOLIV013*.



Etanol teórico=87.52 g/l



Etanol teórico=85.45 g/l

FIGURA 21. Formación de etanol teórico de ITOLIV012 Y ITOLIV013 en mosto de *Agave angustifolia* Haw a las 264 hrs.

3.4 Destilación Simple.

Se realizó una destilación de los mostos fermentados para obtener muestras para llevarlas a analizar en un futuro y estimar su porcentaje de alcohol verdadero, se obtuvieron aproximadamente 5 ml de destilado de cada muestra, correspondiente a destilación normal y con cobre.



FIGURA 22. Equipo de Destilación Simple.

CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

La cepa de *Zymomona* fue aislada exitosamente y *catalogada* como *ITOLIV013* se pudo encontrar en mosto de *Agave potatorum* con 3 días de fermentación pH 3.5 y 3.9 °Brix, y una aislada con anterioridad en mosto de *Agave americana* con 4 días de fermentación, pH 4.5 y 4.5°Brix, ambas del palenque de Teozacoalco.

Como pudimos observar en las gráficas, la *ITOLIV012*, hubo mejor: crecimiento celular, generación de biomasa, consumo de sustrato y mejor producción de etanol teórico, por lo cual esta cepa presenta una mayor afinidad por la sacarosa y en segundo lugar la fructosa.

Mientras tanto la *ITOLIV013*, presento similitudes de preferencia con glucosa y sacarosa, en consumo de sustrato y producción de etanol teórico, por lo que esta cepa se puede desarrollar de forma óptima tanto en sacarosa como en glucosa.

La sacarosa es un disacárido formado por glucosa y fructosa, es por ello que presenta una afinidad más por este sustrato, debido a que los mostos de agave de donde fueron aislados contienen en su mayoría fructosa y glucosa.

En el medio estándar pudimos observar la *ITOLIV013* como mejor productora de etanol teórico, mientras que en el mosto de *Agave angustifolia* pudimos observar una ligera similitud entre *ITOLIV012* Y *ITOLIV013*.

No se obtuvieron resultados de *Zymomona* en *Agave angustifolia* de San Pedro Teozacoalco ni en *Agave Karwinskii* de San Luis Amatlán Miahuatlán, a pesar de que las muestras estaban dentro de los primeros días de fermentación.

Por su asimilación y preferencias de sustrato se sugiere investigar y probar en el campo de aplicación en la elaboración de diversas bebidas alcohólicas, así como

también en la producción de alcohol de caña y la producción de Bioetanol, siendo esta última de gran interés en los últimos años.

También se sugiere llevar a analizar las muestras obtenidas en la destilación para corroborar el porcentaje de alcohol verdadero.

CAPITULO 5. BIBLIOGRAFIA.

- Abarca Arauz Ricardo Javier. (2010). Aislamiento y Caracterización de la Bacteria *Zymomona mobilis*. Guayaquil, Ecuador. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Químico.
- Abdel, W., Fadil, M. Nigam, P. y Banat, M. 1999. Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale Fermentation in an Egyptian distillery. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Albalasmeh, A.; Berhe, A. A.; Ghezzehei, T. "A new method for rapid determinación of carbohydrate and total carbón concentrations using UV spectrophotometry". *Carbohydr Polym.* 2013, 97 (2), 253–261. DOI 10.1016/j.carbpol.2013.04.072.
- Alarcón Elías Aurea Victoria, (2010) Producción de Bioetanol con *Zymomona Mobilis*. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias en bioprocesos. México D.F.
- Arcos, Martha Liliana, & Ossa, Faisury, & Díaz, Tito Efraín (2004). Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5(1),60-63. [fecha de Consulta 30 de diciembre de 2021]. ISSN: 0122-8706. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449953025009>.
- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances* , 26, p 89-105.
- Beatriz Brito Grandes, Lozano Rodríguez Pedro (1999). Fermentación Alcohólica de procesados industriales de durazno utilizando bacterias *Zymomonas mobilis*. *Revista informativa del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias*. INIAP.España.
- Berry, D. y Watson, C. 1987. Production of organoleptic compounds. In: *Yeast Biotechnology*. Allen y Unwin. Pp. 345-364.

- Doelle, H. W., *et al.* (1993) *Zymomonas mobilis* – Science and Industrial Application. Critical Review in Biotechnology. Australia. Volumen(1): 57-98-.
- Conway T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: History, Physiology and molecular biology. FEMS Microbiol Rev .103:1-28.
- Choi, GW., Kang, HW., Kim, YR. *et al.* (2008). Ethanol production by *Zymomonas mobilis* CHZ2501 from industrial starch feedstocks. *Biotechnol Bioproc E* **13**, 765–771
<https://doi.org/10.1007/s12257-008-0184-3>.
- Davis, L., Rogers, P. L. (P. L.), Pearce, J., & Peiris, P. (2006). Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. *Biomass & Bioenergy*. Retrieved from <http://ezproxy.uws.edu.au/login?url=http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.05.003>.
- De Ley J, Swings J (1977). The Biology of *Zymomonas*. Laboratory of Microbiology and Microbial Genetics, Faculty of Sciences, State University, B-9000 Gent, Belgium. *Bacteriological Review*.
- Durán, G.H.M., González G.E.J., Matadamas O.P. (2007). Mechanization Process in the production of mezcal. Journal of Food Agriculture and Environment.
- DUNN I., HEINZLE E. (2003). “Biological Reaction Engineering”. WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA. Second Ed.
- Estrada, G, A., Cruz, G, A., Lappe, P., Ulloa, M., García, G, M. y Gómez, R, L.(2001). Isolation and identification of killer yeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque. Worlds Journal of Microbiology and Biotechnology.
- Escalante, M. P., Blaschek, H.P., Barba, D. A., Santos, L., De León R. A. (2008) Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentación of Agave salmiana. Letters in Applied Microbiology.
- Escalante, A. Rodríguez, M. Martínez, A. López-Munguía, A. Bolívar, F. Gosset, G Fems, (2004). Microbiol. Letters.
- Espinosa Mendoza Diana Cecilia (2013) evaluación de la producción de etanol y compuestos congénicos en mostos de agave potatorum utilizando

levaduras aisladas de fermentaciones de mezcal. Tesis para obtener el grado de químico en alimentos. México D.F.

- García Garibay Mariano, López Agustín, Quintero Ramírez Rodolfo, Agustín López-Mungia Canales, (2002) Biotecnología alimentaria, editorial Limusa, Quinta reimpresión, México D. F, pp 619-627.
- García Ortega Mauricio Adrián, Ponce Rivas Elizabeth, (2004). Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Etner -Doudoroff. BioTecnología aplicada. Cuba.
- Gutiérrez Mora, A. (1987). Estudio del rendimiento en la producción de alcohol en una Cepa de *Zymomonas mobilis* aislada de jugo de caña. Guadalajara. Jalisco: Universidad de Guadalajara.
- Hall, M. B. "Efficacy of reducing sugar and phenol–sulfuric acid Assay for analysis of soluble carbohydrates in feedstuffs". Anim Feed Sci Technol. 2013, 185 (1- 2), 94–100. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2013.06.008.
- Ingram, L. O., Eddy, C. K., Mackenzie, K. F., Conway, T., & Alterthum, F. (1989). Genetics of *Zymomonas mobilis* and ethanol production. *Dev. Ind. Microbiol*, 30, 53-69.
- Lachenmeier, D, W., Sohnius, E, M., Attig, R. y López, M, G. 2006. Quantification of selected constituents and Anions in mexican agave Spirits (tequila, mezcal, sotol, bacanora). Journal and Agricultural and Food Chemistry 54: 3911-3915.
- Lappe, O, P., Moreno, T, R., Arrizón, G, J., Herrera, S, T., García, M, A. y Gschaedler, M, A. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. FEMS Yeast Research 8: 1037-1052.
- LEE, W.C y HUANG, C.T. (2002). "Modelling of Ethanol Fermentation Using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 Grown on the Media Containing Glucose and Fructose" Biochemical Engineering Journal, 4:217-227.
- López Sánchez Claudia, Espinoza Martínez Adrián, Palma cruz Felipe de Jesús. (2020). Consorcio microbiano de la fermentación de mezcal artesanal de san Dionisio Ocotepec Oaxaca. Artículo de investigación Revista de

centro de Graduados e investigación. Instituto tecnológico de Mérida. Vol.35 Num.83, PP.44-47 sep2020 ISSN 0185-6294.

- Matiz, Adriana, & Torres, Claudia, & Poutou, Raúl A. (2002). Producción de etanol con células inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* spp. Revista MVZ Córdoba, 7(2),216-223. [fecha de Consulta 29 de agosto de 2021]. ISSN: 0122-0268. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69370204>.
- Maldonado, Claudia M., & Bayona, Martín A., & Poutou, Raúl A. (2001). EFECTO ANTAGONICO DE *Zymomonas mobilis* spp. FRENTE A *Salmonella* sp. y *Proteus mirabilis*. Universitas Scientiarum,[fecha de Consulta 8 de septiembre de 2021].
- Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura, S.; LEE, Y. C. "Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format". Anal biochem. 2005, 339 (1), 69–72. DOI 10.1016/j.ab.2004.12.001.
- Mesas, J, M. y Alegre, M, T. 1999. El Papel de los microorganismos en la elaboración del vino. Ciencia y Tecnología de alimentos. 2:174-183.
- Monsigny, M.; Pett, C.; Roche, A C. "Colorimetric Determination of Neutral Sugars by a Resorcinol Sulfuric Acid Micromethod". Anal Biochem. 1988, 175, 525– 530. DOI 10.1016/0003-2697(88)90578-7.
- Montenecourt BS.(1985). *Zymomonas*, a unique genus of bacteria. In: Demain AL, Solomon, editors. Biology of Industrial Microorganisms. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings, Inc. p. 261-89.
- Morales Thelma, Ríos Leopoldo, Gaona Gerardo, Garza Yolanda, Rodríguez Jesús, (2011). AISLAMIENTO DE *Zymomonas mobilis* DE SAVIA DE MAGUEY PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CELULÓSICO Universidad Autónoma de Coahuila. Departamento de Biotecnología. Saltillo, Coahuila.
- Navarre, C. 1994. Oenologie. Cuarta edición. Editorial. Lavoisier Tec. y Doc.,París, Francia.
- Nakamura Y., Yamashita Y., Kurosumi A., Biochem Eng. (2008). Ethanol Production from Paper Sludge by Immobilized *Zymomonas Mobilis*

- Panesar P., Marwaha S., Kennedy J. (2006). J. Chem. Technol. Biotechnol. Microbial production, Immobilization and applications of β -D-galactosidase 81: 623-635 <https://doi.org/10.1002/jctb.1453>.
- Palma cruz, F. J (1991). El género agave L. y su distribución en el estado de Oaxaca. Tesis de licenciatura en Biología. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala-UNAM.170 p.
- Pinal, L, E., Cedeño, M., Gutiérrez, H. y Alvarez, J, J. 1997. Fermentation parameters influencing Higher alcohol production in the tequila process. Biotechnology Letters 19:1. Pp. 45-47.
- Jacques, H.C., López, H.A.I., Anaya, G.C.L., Sifuentes, R.A.M., Taillandier, P., Ramón, P. F.(2006). Identificación (ID) de Levaduras Aisladas de Mostos de Mezcal: ID Morfológica-Bioquímica (M-B) vs Molecular (Mol). En: Chanona, J., Ordorica, C., Mulet, A., Alamilla, L., Sosa, M.E., Parada, E., Welti, J., Gutiérrez, G. Editores. "Hacia una visión integrada de la ingeniería de alimentos" Libro de artículos en extenso del V Congreso Ibero-Americano De Ingeniería de Alimentos.
- Kalnenieks U. N Galinina, M Toma, J L Pickford, R Rutkis, R K Poole (2006). Adv in Micro Physi. 51: 53-117 Respiratory behaviour of a *Zymomonas mobilis* adhB: kan(r) mutant supports the hypothesis of two alcohol dehydrogenase isoenzymes catalysing opposite reactions. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.08.034.
- Kremer, T.A., LaSarre, B., Posto, A.L., and McKinlay, J.B. (2015) N₂ gas is an effective fertilizer for bioethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 2222– 2226.
- Kirchmayr Manuel R. et. al. (2014). Manual para la estandarización de los procesos de producción del mezcal guerrerense. Centro de investigación y Asistencia en tecnología y diseño del estado de jalisco A.c ISBN - 978-607-95885-9-5.

- Rogers, P., Y. Jeon, K. Lee & H. Lawford. (2007). *Zymomonas mobilis* for Fuel Ethanol and Higher Value Products. *Biofuels*: 263-288.
- Seo, J. S., H. Chong, H. S. Park, K. O. Yoon, C. Jung, J. J. Kim, J. H. Hong, H. Kim, J. H. Kim, J. I. Kil, C. J. Park, H. M. Oh, J. S. Lee, S. J. Jin, H. W. Um, H. J. Lee, S. J. Oh, J. Y. Kim, H. L. Kang, S. Y. Lee, K. J. Lee & H. S. Kang. (2005). "The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4." *Nature Biotechnology* 23(1): 63-68.
- Torija, M, J. 2002. Ecología de levaduras selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Tesis de doctorado. Universitat Rovira I Virgili. Departament de Bioquímica I Biotecnologia. Facultat d'Enologia.
- Vaughan EE, Hugenholtz J. (2013). Food biotechnology. Current opinion in biotechnology. 24(2), 121–123. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.01.010>.
- Velasco Velasco Vicente Arturo, Guzmán Sebastián Karen del Carmen, Ruíz Mario Jiménez, Ruiz Luna Judith, Enríquez del Valle José Raymundo. (2017), concentración mineral en etapas del proceso de elaboración del mezcal en tres especies de Agave, Artículo de investigación ISSN: 2007-9559, Revista Mexicana de Agroecosistemas Vol. 4(2): 91-102, 2017.
- Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K., Okamoto, K. (2002). Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J. Biochem.* 132: 565-572.
- Zambonelli, C. 1988. Microbiología y biotecnología del vino. Ed. Edagricole, Bolonia.
- Zhang M, Eddy C, Deanda K, Finkelstein M, Picataggio S. (1995). Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanogenic *Zymomonas mobilis*. *Science*;267:240-3.